

2^{ème} Séminaire annuel du Labex DRIIHM–18 et 19 juin, Montpellier

Génotoxicité des particules de sol et atmosphériques dans les territoires des OHM-BMP et Estarreja

Institut
Méditerranéen
de Biodiversité
et d'Ecologie
marine et continentale

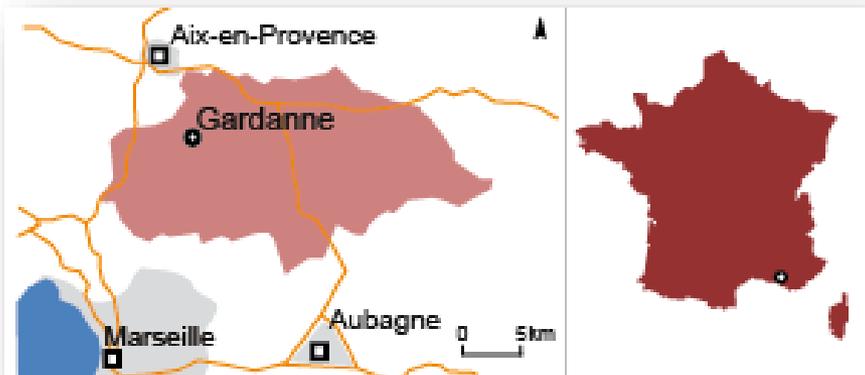
Sophie Plumejeaud

Axe 6 IMBE, Equipe BSHE 18.6.2014

Observatoires Hommes-Milieus

Bassin Minier de Provence (BMP)

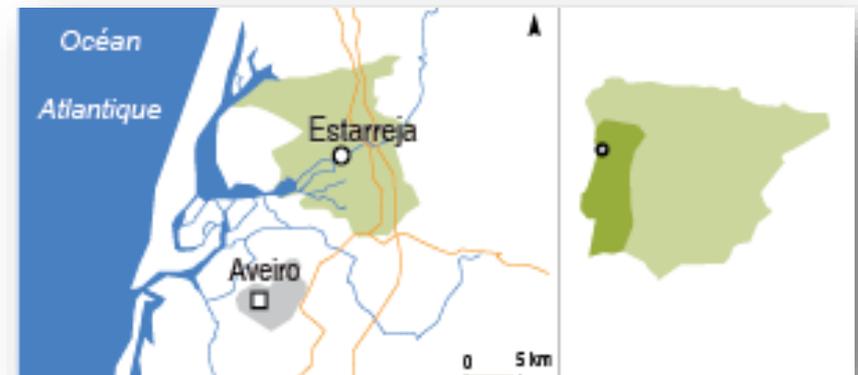
2 complexes industriels importants avec un fort impact urbain, traversés par des axes routiers très fréquentés ainsi que par des voies ferrées



Pendant \approx 2 siècles : exploitation du lignite (charbon avec 65 à 75% de carbone)

Nombreuses usines implantées : usine d'alumine, cimenterie, centrale thermique...

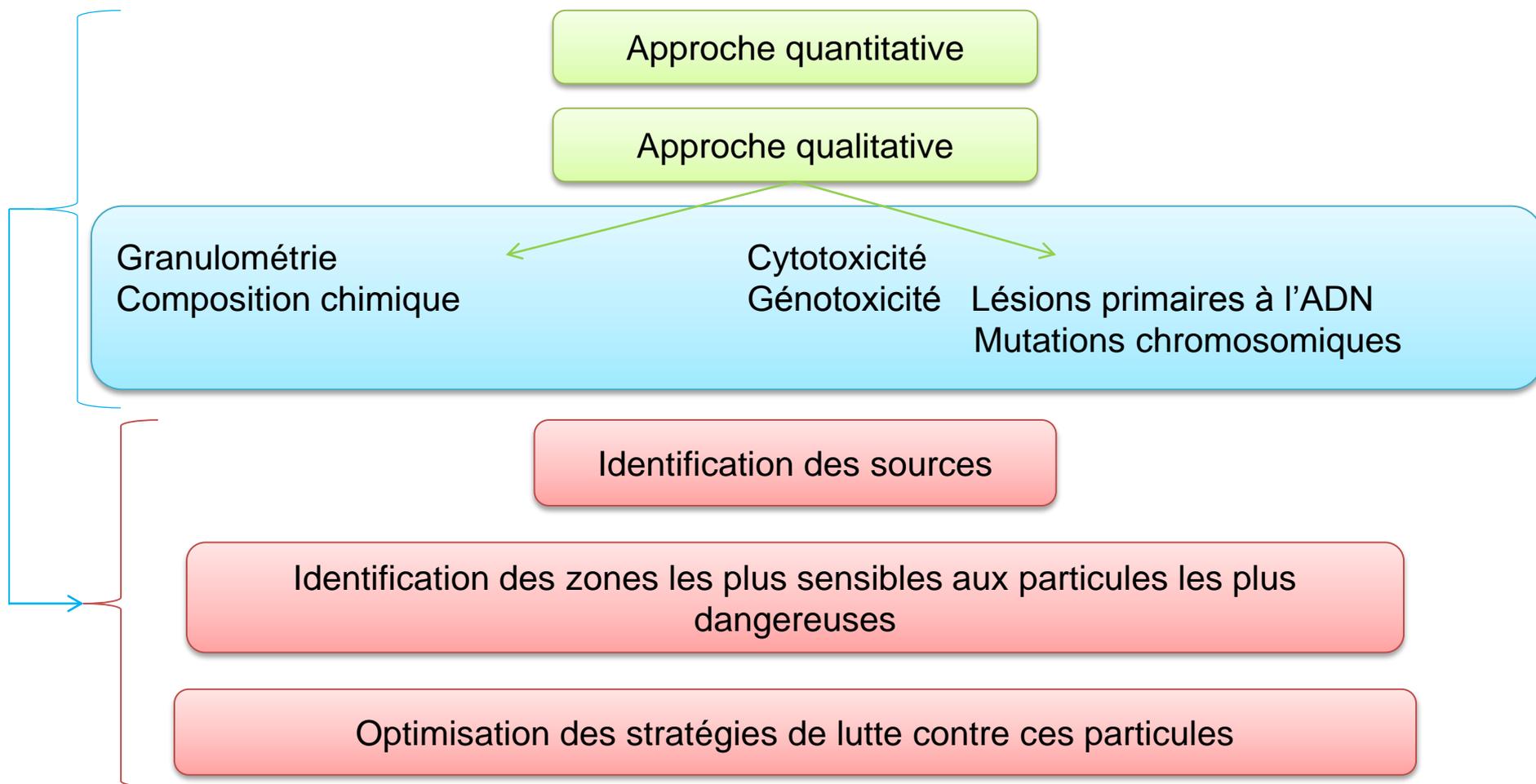
Estarreja, district d'Aveiro



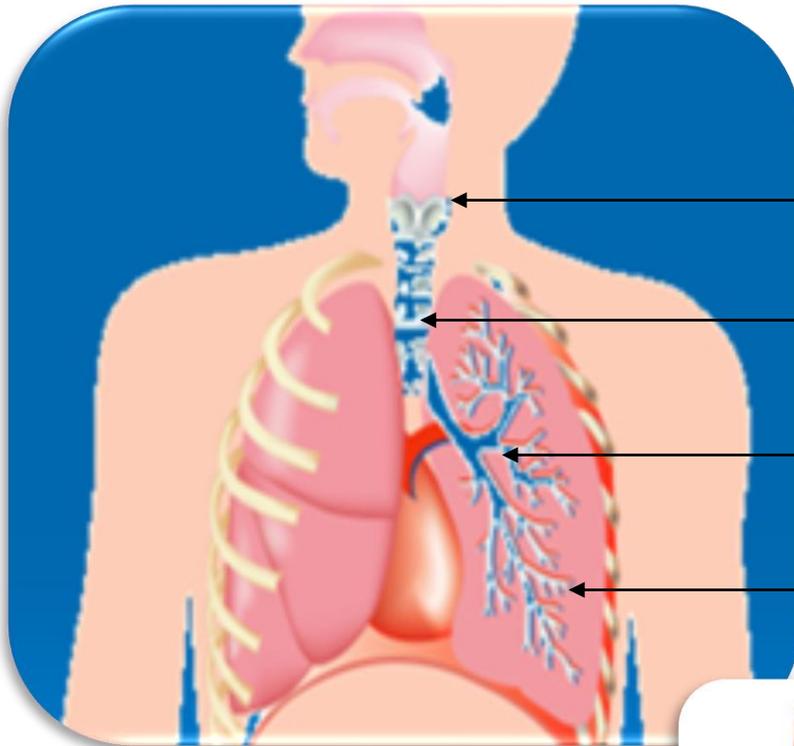
2^{ème} plus grand complexe d'industries chimique du Portugal

Projet

Etude des particules atmosphériques fines PM_{2.5} (<2,5µm) et des particules de sols (<250µm) dans les territoires des OHM-BMP et OHM-Estarreja susceptibles d'être inhalées et/ou ingérées par les enfants en bas-âge (<6 ans)



Inhalation des PM_{2.5}



Organes exposés :

Nez et gorge

Trachée

Bronches et Bronchioles

Alvéoles pulmonaires



PM_{2.5}

Passage possible à travers la membrane pulmonaire pour gagner la circulation systémique

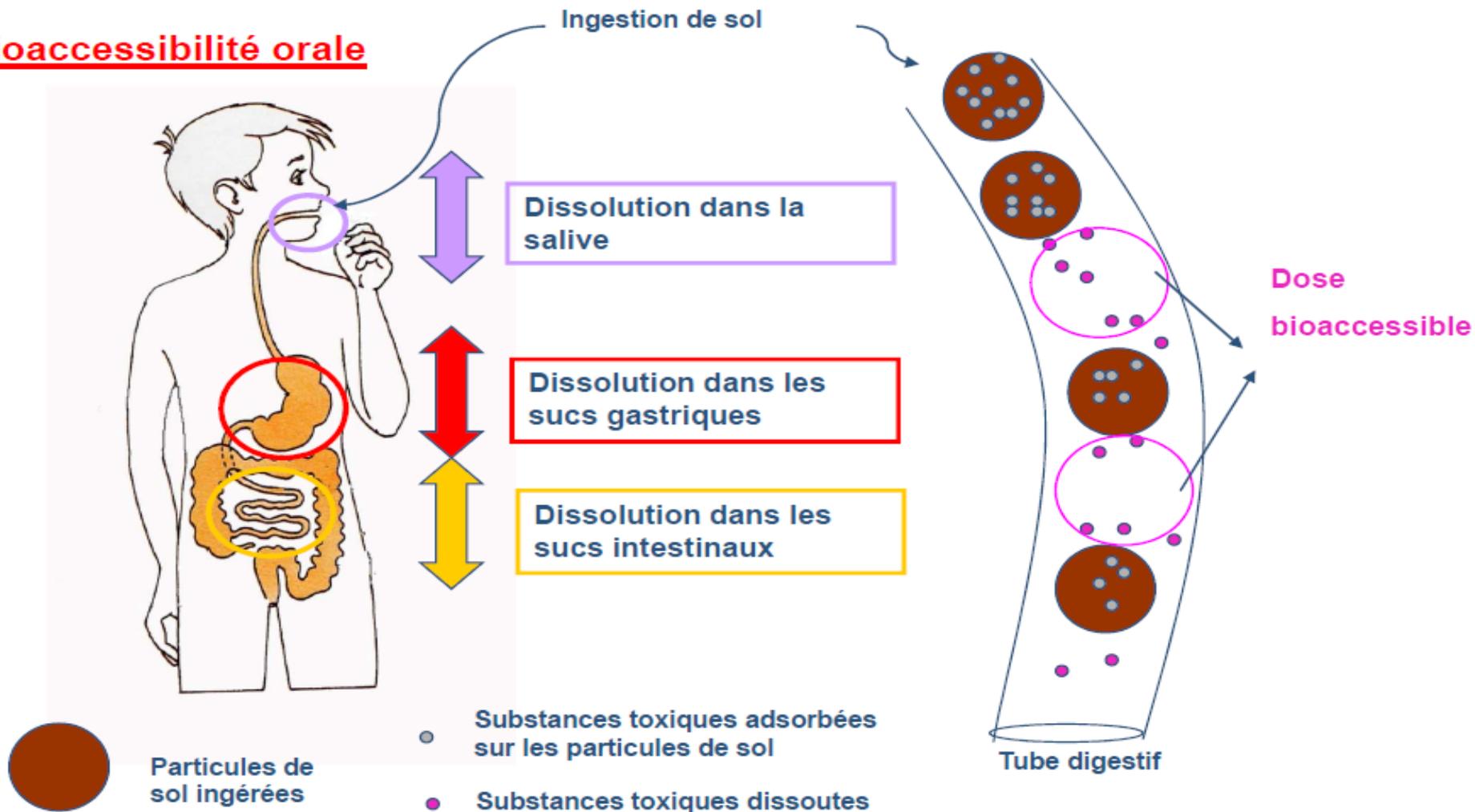


Toxicité

Ingestion de poussières de sol

Voie d'exposition prépondérante chez les enfants en bas-âge (moins de 6 ans)
due au portage main-bouche

Bioaccessibilité orale

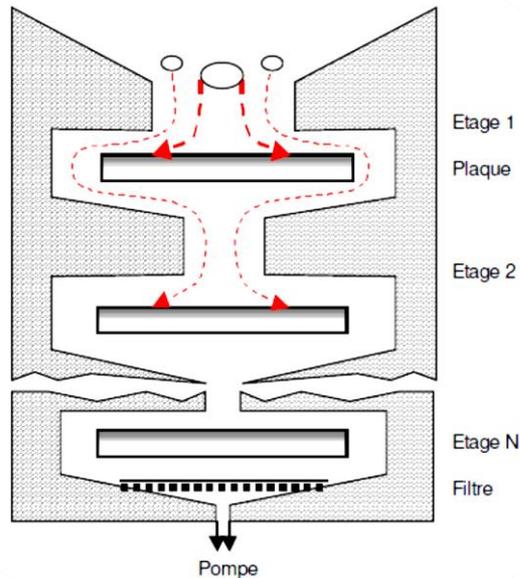


Emilie Gardeur-Algros, Eurofins Expertises Environnementales, Intersol 2013

Echantillonnage et extraction des composés

Particules atmosphériques

Impacteur en cascade



Période de prélèvement : 24 heures

Plaque d'impaction

2 mg/l de PM_{2.5} totales dans milieu de culture cellulaire

Particules de sol

Echantillons prélevés en surface 0 à 10 cm

Travail sur la fraction PM < 250 µm

Méthode UBM

Unified BARGE (BioAvailability Research Group Europe) Method

Technique recréant les compartiments digestifs : bouche, estomac et intestin

Extraction des métaux bioaccessibles

fraction maximale d'un composé extractible par solubilisation dans les fluides physiologiques et potentiellement disponible pour l'absorption à travers les tissus

Caractérisation physico-chimique et cyto-génotoxique

Particules
atmosphériques

Poussières au sol

PHYSICO-CHIMIQUE

Composés organiques
HAP & dérivés
Métaux

Métaux
± étude spéciation

CYTOTOXICITE

Test du WST-1

Cellules poumon
humain
BEAS-2B

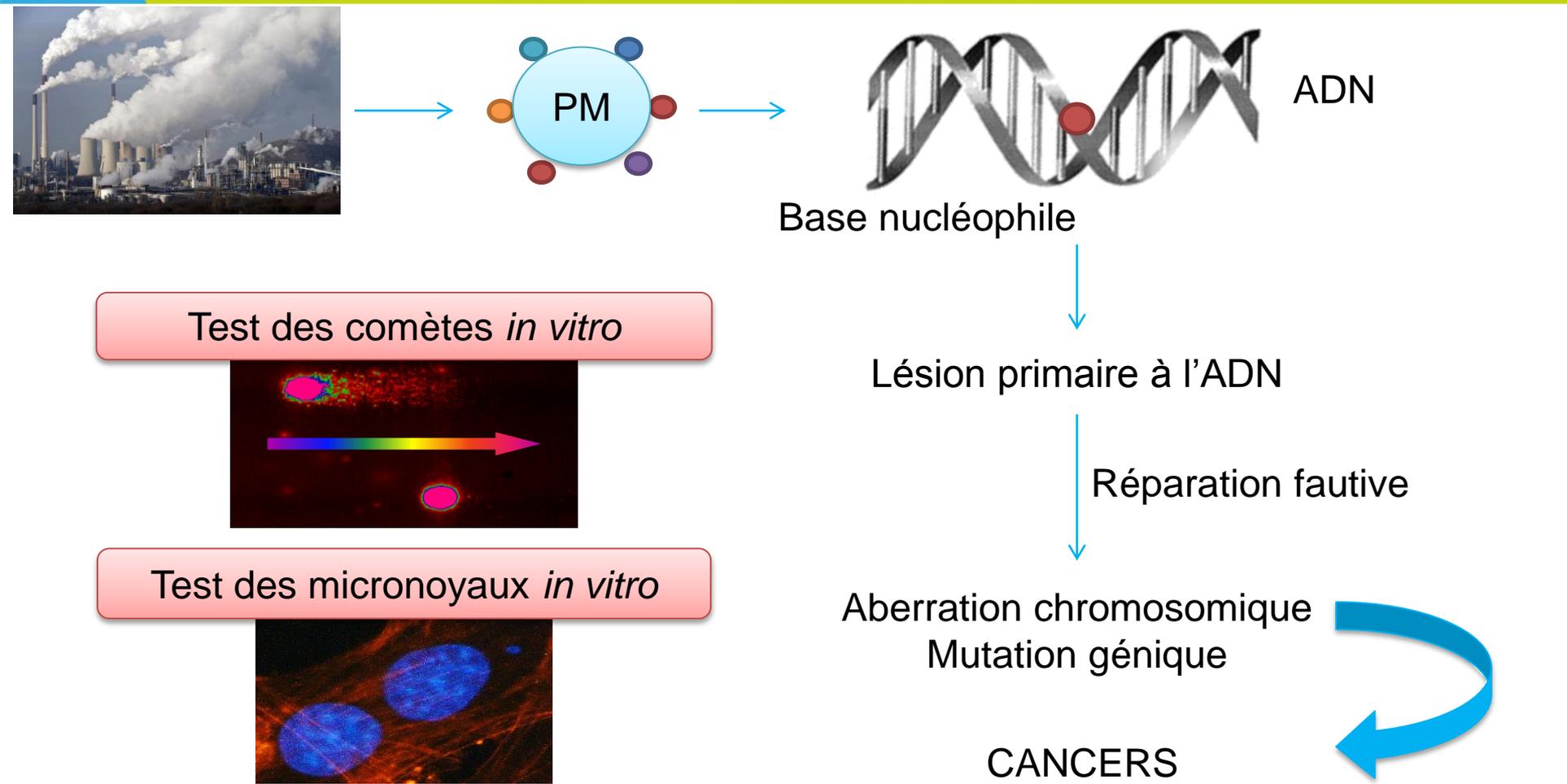
Concentrations de travail

Cellules gastriques
AGS

GENOTOXICITE

Test des comètes
Test des micronoyaux

Génotoxicité



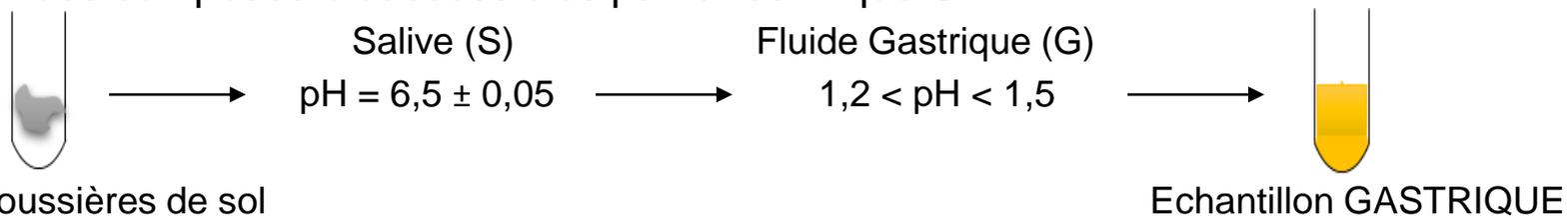
Classification CIRC

Fines particules diesel : groupe 1 - carcinogènes
Particules fines provenant d'autres sources :
groupe 2A – carcinogènes probables

Poussières de sol

Prélèvements de poussières de sol dans des maisons à proximité du complexe industriel d'Estarreja

Extraction des composés bioaccessibles par la technique UBM



Analyse de la composition en métaux bioaccessibles

Métaux	Al	V	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	As	Zr	Mo	Cd	Sn	Sb	Ba	La	Ce	Pb
Echantillons	mg/Kg																		
1	2554,6	6,4	15,6	98,4	2,0	31,9	82,1	1260,3	0,8	3,6	1,3	0,2	0,7	3,8	0,5	44,6	2,8	6,4	52,2
2	2757,4	7,8	15,9	191,5	2,7	23,2	111,2	951,2	0,9	7,4	0,9	0,1	1,2	0,6	0,5	66,1	3,0	5,8	99,6
3	2704,6	5,7	31,3	79,7	2,6	29,4	70,1	826,6	1,1	4,8	1,2	0,1	0,8	2,0	0,7	35,6	4,8	9,5	78,3
4	2720,9	4,9	31,3	88,5	2,2	54,9	197,9	1220,4	1,1	4,2	1,1	0,1	1,1	2,7	1,1	54,1	7,5	10,7	74,0
5	1071,9	4,1	4,7	57,0	1,2	23,2	110,8	4446,0	0,4	4,3	0,3	0,1	1,8	0,3	0,4	28,2	2,8	3,9	218,1
6	2176,6	5,5	17,0	121,4	2,9	36,0	118,6	852,3	0,6	4,3	0,8	0,4	0,6	8,7	1,2	39,7	1,7	3,2	56,7
7	3113,9	11,0	9,8	157,1	2,0	21,1	58,1	657,6	1,1	8,3	2,0	0,1	0,9	1,2	0,5	49,5	3,0	5,2	245,3
8	4392,9	6,0	15,7	80,8	1,7	34,9	46,3	1443,2	1,0	8,2	0,9	0,2	0,6	1,5	0,5	29,4	4,1	6,0	165,3
9	3483,7	6,8	16,3	196,5	2,0	33,1	44,4	946,4	1,1	9,7	0,9	0,1	0,7	0,9	0,5	47,0	2,8	4,9	65,7

Cytotoxicité

Test WST-1

Principe

Le sel de tetrazolium, WST-1, est clivé *via* les réductases de la chaîne respiratoire des mitochondries des cellules vivantes produisant du formazan. La quantité de formazan produite est directement corrélée au nombre de cellules viables en culture.

L'absorbance de chaque puits est mesurée à 450nm après soustraction du bruit de fond à 692nm par un spectrophotomètre.

But

Détermination du % de viabilité cellulaire pour définir les concentrations de travail pour la génotoxicité

Résultats

Conditions	Solution Gastrique
T-	100
T+	45
Pure	4
1/2	28
1/3	70
1/4	82
1/5	90
1/10	91

1/2 < 50 % viabilité cellulaire < 1/3

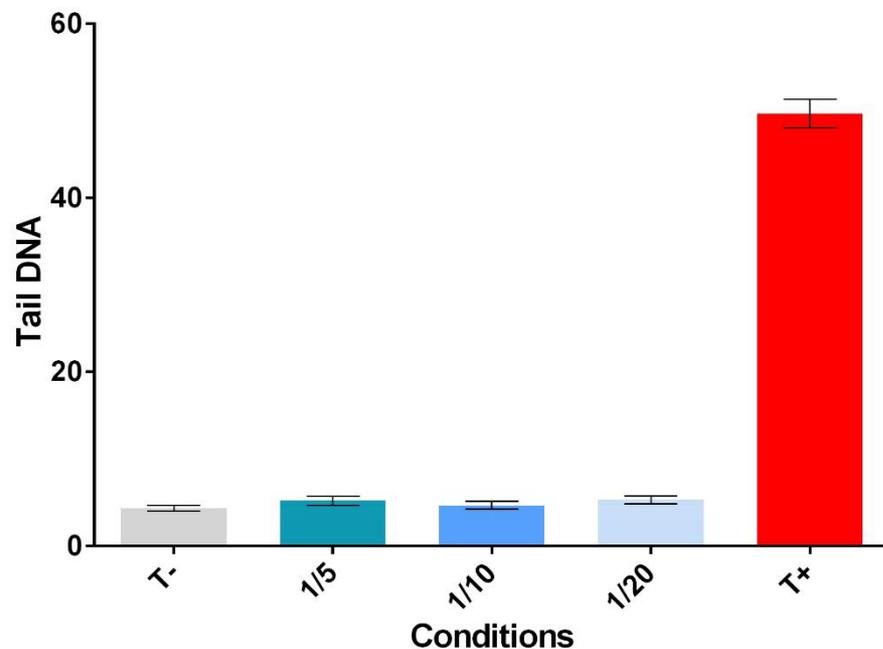
A partir de 1/5^{ème} cytotoxicité stable

Etudes préliminaires de génotoxicité

Mise au point sur Blanc Gastrique

Test des comètes

Comètes sur AGS



Test des micronoyaux

Conditions	Mono	Bi	Multi	CBPI	% Cytostase
T-	241	259	0	1,5	0
Colchicine	404	88	8	1,2	50
Mitomycine C	322	177	1	1,4	18

Projet & perspectives

OHM-BMP

Etude en collaboration avec Air PACA

Prélèvements des PM_{2.5} et des poussières de sol en cours

OHM-Estarreja

Tester le génotoxicité des extraits UBM grâce aux des comètes et des micronoyaux sur les cellules gastriques

Collaborer avec une équipe d'Estarreja possédant un impacteur en cascade pour prélever les PM_{2.5}

Méthodologie

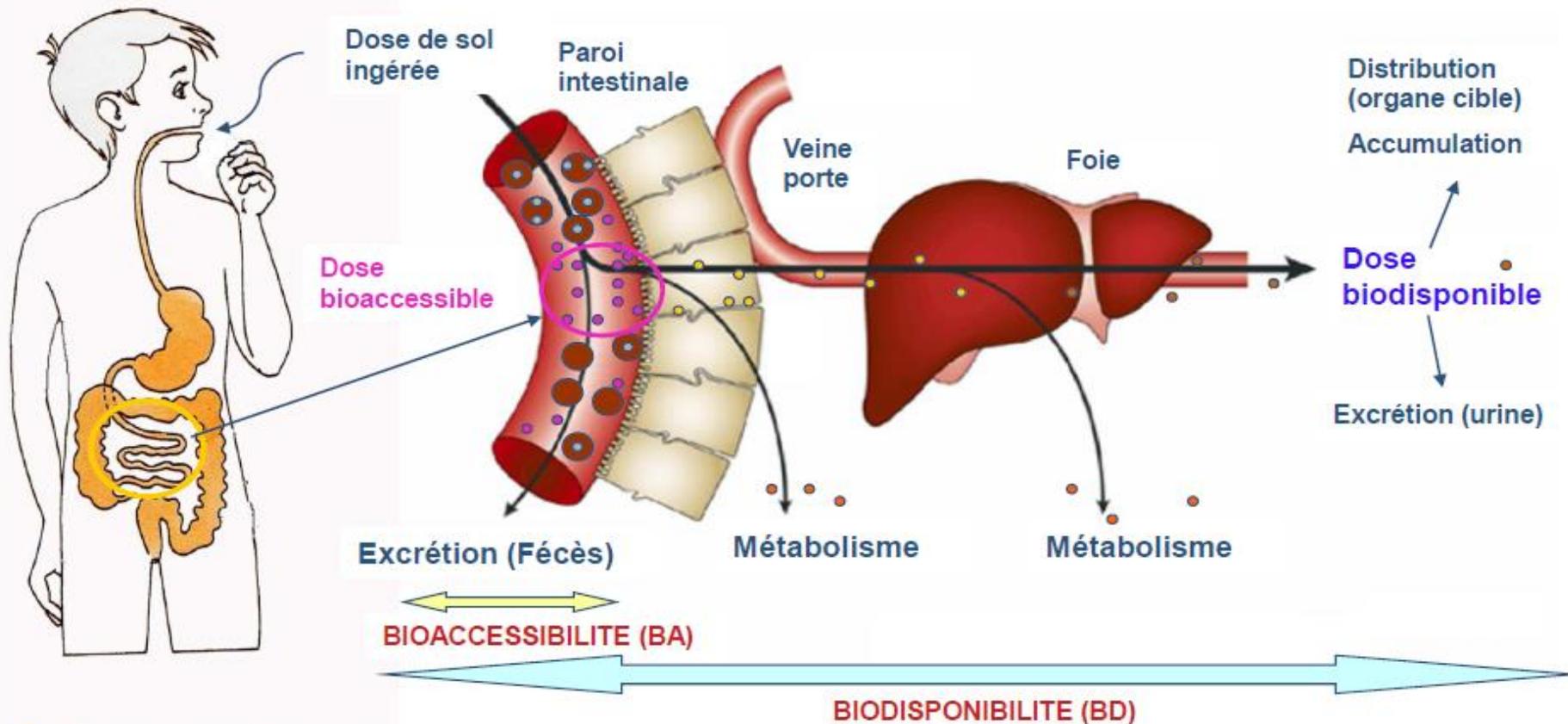
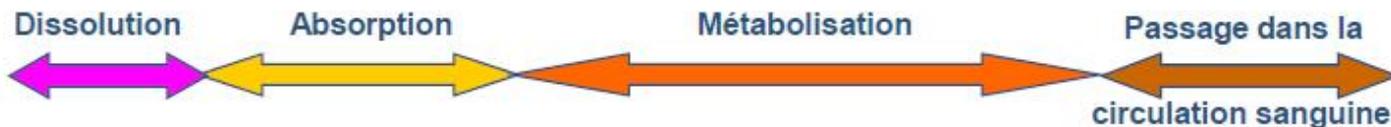
Mise au point des tests de génotoxicité sur les cellules épithéliales bronchiques (BEAS-2B)

Projet soumis à l'ANSES 2014 « Childexpo »

- ❖ Collaboration entre trois OHM (BMP, littoral et Estarreja)
- ❖ Etude du potentiel génotoxique des composés dissous dans les fluides physiologiques tant pour les poussières de sol qu'atmosphériques



Processus global

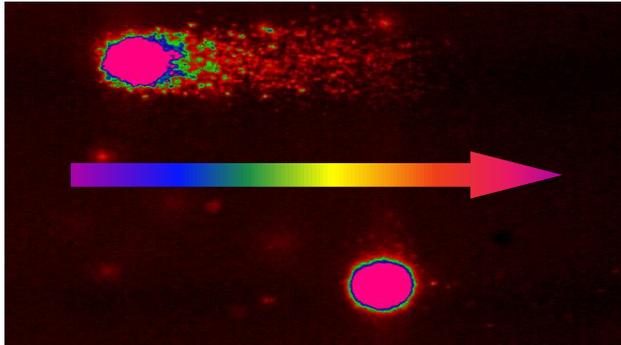


- Particule de sol ingérée ○ Substance toxique ingérée ● Substance toxique dissoute (bioaccessible)
- Substance toxique absorbée ● Substance toxique métabolisée ● Substance toxique biodisponible

Tests de génotoxicité in vitro

Test des comètes

Détection des dommages primaires à l'ADN



ADN de cellules normales :
sphérique

ADN cellules lésées : comète

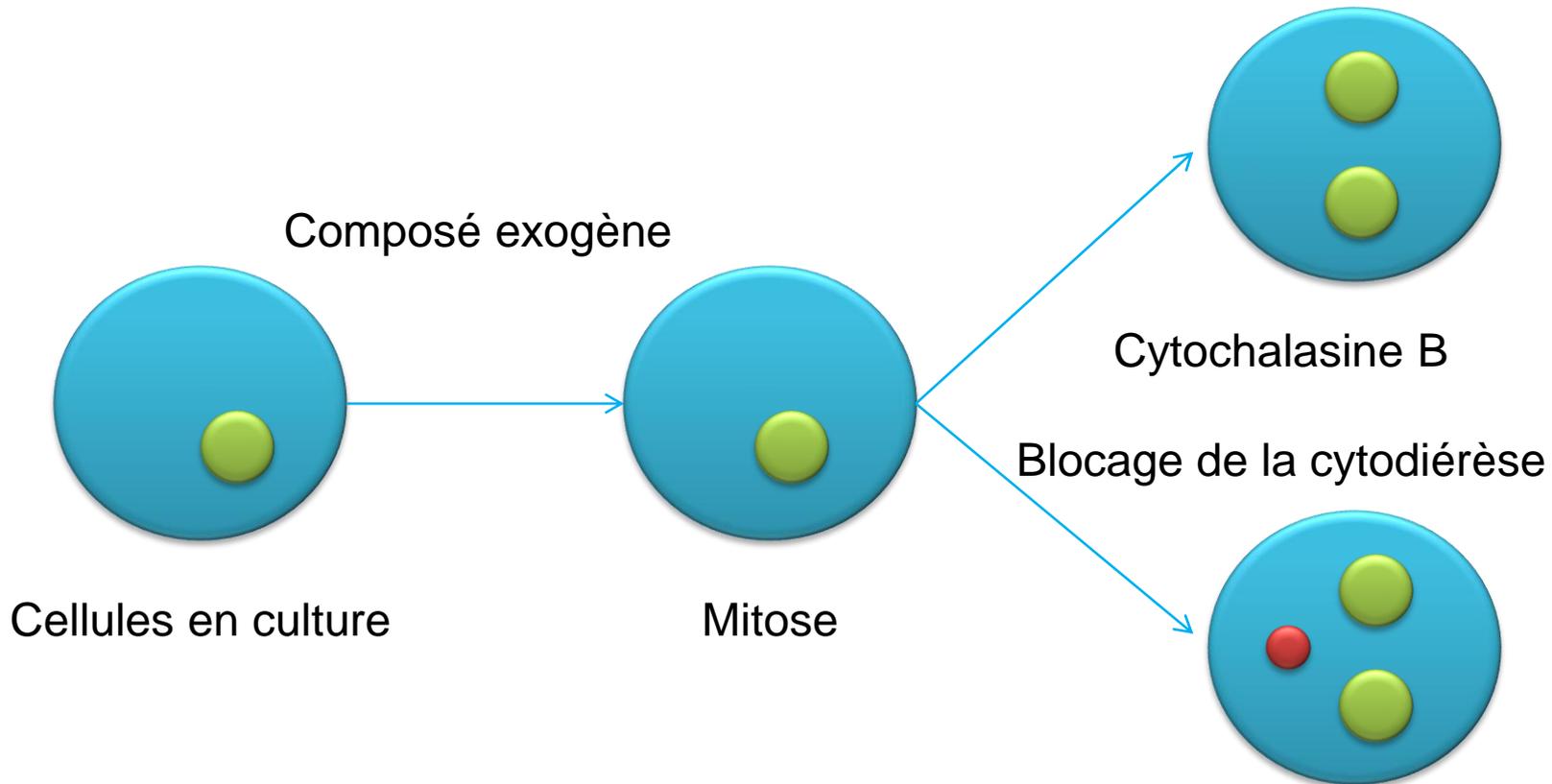
Analyse

Identification de la longueur et l'intensité de fluorescence de la queue de la comète, sur 100 cellules.

Proportionnel au nombre de cassures de brins.

Recherche effet-dose

Test des micronoyaux
Cytokinesis Blocked Micronucleus assay
CBMN



Quantification des dommages chromosomiques structurels ou numériques

Anticorps CREST = marquage des centromères

Différencier les micronoyaux induits par une perte ou une cassure de chromosome

